Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 4, Winter 2024, p. 627-637

Study of Essential Oils Changes and some Biochemical Properties of *Ziziphora clinopodioides* Lam. under Application of Salicylic Acid

S. Sadeqifard[1], M. Azizi[2*], S. Karimi Zinkanlu[3]

1 and 2- Ph.D. Student and Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively
(*- Corresponding Author Email: azizi@um.ac.ir)
3- M.Sc. Graduated, Department of Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 17-10-2016 Revised: 18-06-2017 Accepted: 03-10-2017 Available Online: 03-10-2017	**How to cite this article:** Sadeqifard, S., Azizi, M., & Karimi Zinkanlu, S. (2024). Study of essential oils changes and some biochemical properties of *Ziziphora clinopodioides* Lam. under application of salicylic acid. *Journal of Horticultural Science*, *38*(4), 627-637. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2021.59045.0

Introduction

Growth regulators play a vital role in developmental stages of plants and their use can be improved the yield of crops. One of the most important compounds that used as growth regulators in recent years is salicylic acid. The application of salicylic acid in the activation of systemic acquired resistance, and metabolite synthesis and antioxidant enzymes has been proved. Also, salicylic acid as a natural compound has potential to prevent ethylene production and its effect. In order to evaluate the effect of salicylic acid in different concentration on yield and oils content of *Ziziphora*, a split plot experiment with three replications during 2014-2015 in the field of Agricultural Faculty of Shirvan and Ferdowsi University of Mashhad laboratories was conducted.

Materials and Methods

This research was conducted during 2014-2015 under field conditions in a split plot design in time, at Shirvan Agricultural Research Station (latitude 40 º / 37, longitude 93 º / 57 and with a height of 1097 m above sea level) and in laboratory Department of Horticultural Sciences, Ferdowsi University of Mashhad. Each plot had an area of 4 square meters in furrow planting way which the distance between rows were 50 cm and on rows 15 cm and were carried out on 25 March 2014. Irrigation was carried out immediately after planting, and a second irrigation was done 20 days later, once the seeds had germinated. Irrigation and weed control are also done manually once a week. Salicylic acid (Sigma Aldrich, 99.5%) in the three phases of plant growth (The onset of vegetative growth, throughout vegetative growth, and at the flowering stage), at concentrations (0, 10^{-2}, 10^{-4} and 10^{-6} M) in three repeats were sprayed. The first spraying (The onset of vegetative growth) was done on April 3, 2014, the second spraying (throughout vegetative growth) on May 4, and the third (at the flowering stage) in early June 2014. The plants were harvested on July 20. To measure the dry weight of the plants, the samples were dried in the shade for a week. Essential oil content was determined using a 30-gram dry sample in 500 ml of water through hydro-distillation with a Clevenger apparatus for 4 hours. For biochemical characteristics first samples extract were obtained. To prepare extracts, dry samples were milled then one gram of each sample was transferred to the 50 ml Erlen and 10 ml of 80% methanol was added and shaken for 24 hours. After 24 hours the extract was filtered using filter paper then used for measuring phenols, flavonoids and antioxidant activity. Phenol measurement: phenolic content was measured using the Folin reagent. In 5.0 mL of each extract (10 milligrams per ml) 5.2 ml Folin reagent was added. After five minutes, 300 ml of a molar sodium carbonate solution is added and maintained in a 40 °C bath for 30 minutes. The sample absorbance at 760 nm was measured by a spectrophotometer against the blank. Gallic acid was used as the standard for calibration curve. Flavonoids measurement: Flavonoid content of the samples were measured using aluminum chloride reagent. In 5.0 ml of methanol extract (10 milligrams per ml), 5.1 ml of

https://doi.org/10.22067/jhs.2021.59045.0

methanol, 1.0 ml of 10% aluminum chloride, 1.0 ml of a molar potassium acetate and 8.2 ml of distilled water was added. The mixture kept in dark for 30 minutes and absorbance at a wavelength of 415 nm was read against the blank. Quercetin was used as the standard for calibration curve evaluation. JMP statistical software was used to analyze the data.

Results and Discussion

Based on the results, the application of salicylic acid significantly affected fresh and dry weight, plant height, and phenol and flavonoid content ($P < 0.01$), but had no significant effect on essential oil percentage or yield. The highest fresh weight (264.763 grams per square meter) and dry weight (93.11 grams per square meter) were obtained with the application of 10^{-2} molar salicylic acid during vegetative growth, while the lowest fresh and dry herb yields were observed in the control group. Maximum height of plants (29.01 cm) was related to 10^{-2} M salicylic acid during vegetative growth and the lowest of plant height (23/24 cm) was related to control treatment at the time of flowering. The highest amount of phenols (0.504 mg equivalents gallic acid per gram of dry weight) was detected in plants treated with 10^{-2} M salicylic acid during vegetative growth and the lowest phenols (0.248 mg equivalents gallic acid per gram of dry weight) was reported in 10^{-2}M salicylic acid and during vegetative growth. The highest amount of flavonoids (0.31 mg equivalent Quercetin per gram of dry weight) was obtained in 10^{-4} M salicylic acid treatments during vegetative growth and the lowest of them (0.176 mg equivalent Quercetin per gram of dry weight) was in 10^{-6} M salicylic acid treatment at the beginning of vegetative growth.

Conclusions

In conclusion the results showed that the highest amount of fresh and dry weight and plant height was under the conditions of 10^{-2} M salicylic acid concentration and during vegetative growth and the best yield of essential oils, phenols and flavonoids in during vegetative growth and 10^{-4}M salicylic acid concentration was obtained.

Keywords: Essential oil, Growth regulator, Secondary metabolites

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ٤، زمستان ١٤٠٣، ص. ٦٢٧-٦٣٧

بررسی تغییرات میزان اسانس وخواص بیوشیمیایی گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) تحت تأثیر محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک

سمیه صادقی فرد[۱]- مجید عزیزی[۲*]- سارا کریمی زینکانلو[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۱

چکیده

تنظیم‌کننده‌های رشد، نقش حیاتی در طی مراحل رشدونموی گیاهان ایفا می‌کنند و کاربرد آن‌ها می‌توانند باعث بهبود و افـزایش عملکـرد گیاهـان شوند. یکی از مهم‌ترین این ترکیبات اسیدسالیسیلیک می‌باشد که به‌منظور بررسی اثر محلول‌پاشی اسیدسالیسـیلیک در مقـادیر مختلـف، بـر عملکـرد و متابولیت‌های ثانویه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*)، آزمایشی به‌صورت کرت‌های خرد شده در زمان با سه تکرار در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ در مزرعه دانشکده کشاورزی شیروان و آزمایشگاه دانشگاه فردوسی مشهد به اجرا درآمد. فاکتورهای آزمایشی شـامل زمان‌هـای مختلـف محلول‌پاشـی اسیدسالیسیلیک (در سه زمان: آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گل‌دهی) به‌عنوان فاکتور اصلی و غلظت‌های مختلف اسیدسالیسـیلیک در چهار سطح (10^{-2}، 10^{-4} و 10^{-6} مولار و صفر (شاهد)) به‌عنوان فاکتور فرعی بودند. صفات مورد بررسی در این آزمایش شامل وزن تر و خشک، ارتفاع بوته، درصد و عملکرد اسانس، میزان ترکیبات فنل کل و فلاونوئیدها بودند. اثر متقابل اسیدسالیسیلیک × زمان محلول‌پاشی بر وزن تر و خشک، ارتفـاع بوته، میزان فنل کل و فلاونوئیدهای کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که بیشـترین وزن تـر (۲۶۴/۷ گـرم بـر مترمربـع) و خشک (۹۳/۱ گرم بر مترمربع) در تیمار 10^{-2} مولار اسیدسالیسیلیک در زمان محلول‌پاشی در حین رشد رویشی و کمترین مقـدار آن در شـاهد در زمـان گل‌دهی به‌دست آمد. بیشترین ارتفاع بوته (۲۹ سانتی متر) مربوط به تیمار 10^{-2} مولار اسیدسالیسیلیک و در حین رشد رویشی و کمترین مقدار آن (۲۳/۲ سانتی متر) مربوط به شاهد در زمان گل‌دهی بود. بیشترین میزان ترکیبات فنل کل (۰/۵ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در گرم وزن خشک) در تیمار 10^{-2} مولار اسیدسالیسـیلیک در آغـاز رشـد رویشـی و کمتـرین مقـدار آن (۰/۲۴ میلی‌گـرم معـادل اسـیدگالیک در گـرم وزن خشـک) در تیمـار 10^{-2} مـول اسیدسالیسیلیک در زمان گل‌دهی مشاهده شد. بیشترین میزان فلاونوئید (۰/۳۱ میلی‌گرم معادل کوئرسیتین در گرم وزن خشـک) را تیمـار 10^{-4} مـولار اسیدسالیسیلیک در حین رشد رویشی و کمترین میزان (۰/۱۷ میلی‌گرم معادل کوئرسیتین در گرم وزن خشک) را تیمـار 10^{-6} مـول اسیدسالیسـیلیک در آغاز رشد رویشی به خود اختصاص دادند. بیشترین درصد اسانس (۱/۶۶ درصد) مربوط به غلظت 10^{-2} مولار و در زمان گـل‌دهی و کمتـرین میـزان آن (۰/۳۳ درصد) مربوط به شاهد (صفر) و در حین رشد رویشی بود. همچنین نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بالاترین عملکرد اسـانس (۱/۱۴۲ میلی‌گرم در مترمربع) در حین رشد رویشی و در غلظت 10^{-2} مولار اسیدسالیسیلیک و کمترین میزان آن (۰/۲۲۱ میلی‌گرم در مترمربع) در زمان گل‌دهی و در شاهد مشاهده گردید. در مجموع، می‌توان اظهار نمود که به‌منظور دستیابی به بالاترین میزان عملکرد اسانس، میزان فنـل کـل و فلاونوئیـد کـل، محلول‌پاشی غلظت اسیدسالیسیلیک 10^{-2} مولار در حین رشد رویشی مناسب‌ترمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، تنظیم‌کننده رشد، متابولیت‌های ثانویه

مقدمه

گیـاه دارویـی و معطـر کـاکوتی بـا نـام علمـی (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) متعلق به تیره نعناعیان است (Naghibi *et al.*, 2005). گیاهی چندساله با قاعده چوبی، به ارتفـاع هفـت تـا ۵۰ سانتی‌متر است. برگ‌ها بـدون دم‌بـرگ، خطـی و سـرنیزه‌ای هسـتند.

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران
۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی،دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: azizi@um.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jhs.2021.59045.0

متشکل از گل‌های متعدد بدون دم‌گل، به رنگ سبز یا بنفش، جام گل سفید، صورتی تا بنفش، میوه فندقه و به رنگ قهوه‌ای می‌باشد . گیاهان تیره نعناع در معالجه امراض معده و به‌عنوان ضدعفونی‌کننده برای رفع سرماخوردگی به‌کار می‌رود (Babakhanloo, 1998). اجزاء کاکوتی کوهی فعالیت آنتی‌توموری دارد (Chachoyan & Oganesyan, 1996) و می‌توان از آن در درمان تب، دردهای قاعدگی و تونوس معده استفاده کرد. نتایج تحقیقات صالحی و همکاران (Salehi *et al.*, 2005) روی شناسایی ترکیبات اسانس کاکوتی نشان داد که از ۹۹/۵ درصد ترکیبات شناسایی شده اسانس این گیاه، ۹۳/۳ درصد آن مونوترپن‌های اکسیژنه از جمله پولگون (۴۸/۵ درصد)، پیپریتنون (۱۷/۴درصد)، پی منت-۳-ان-۸-ال (۱۲/۵درصد) و تیمول (هشت درصد) می‌باشد (Salehi *et al.*, 2005). ترکیب اصلی و غالب اسانس کاکوتی همانند سایر گونه‌های این جنس، پولگون است (Pastírová *et al.*, 2004).

اسیدسالیسیلیک یا اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید، یک ترکیب فنولی طبیعی با حلقه آروماتیک و یک گروه هیدروکسیل است و به‌عنوان یک القاءکننده مؤثر در بیان ژن‌های مقاوم شناخته شده است که پس از افزودن به سطح بیرونی بسیاری از گیاهان، پروتئین‌های مربوط به تنش را به رمز در می‌آورد (Kumar *et al.*, 1997). اسیدسالیسیلیک به‌عنوان یک شبه‌هورمون فنولیک تنظیمات درون گیاه را انجام می‌دهد و نقش آن در سیستم دفاعی در مقابل تنش‌های زیستی (عوامل بیماری‌زا) و غیر زیستی (عناصر سنگین، شوری، خشکی و ازن) به‌خوبی مشخص است (Mahdipour, 2013).

در سال ۱۸۲۸ یوهان باخنر، موفق به جدا نمودن مقداری از سالیسیلین و گلوکوزید از سالیسیلین الکل گردید که سالیسیلات عمده در پوست درخت بید (*Salix alba*) به‌شمار می‌رفت و نام‌گذاری آن با توجه به‌نام لاتین درخت بید صورت گرفت (Jamzad, 2009). در سال‌های اخیر، مطالعات زیادی به‌منظور بررسی اثر اسیدسالیسیلیک بر میزان کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی انجام گرفته است و در بسیاری از پژوهش‌های انجام شده، اسیدسالیسیلیک به‌عنوان القاکننده ترکیبات ثانویه گیاهی معرفی گردیده است. وجود اسیدسالیسیلیک به‌عنوان یک ترکیب افزوده در محیط کشت، افزایش ترکیبات فنل کل را به همراه داشته است (Mozaffarian, 1998). کاربرد خارجی اسیدسالیسیلیک در دامنه‌ای از فرآیندهای مختلف در گیاهان مانند جوانه‌زنی بذور (Kumar *et al.*, 1997)، بسته شدن روزنه‌ها، تبادل و انتقال یون‌ها اثر داشته است. تیمار اسیدسالیسیلیک در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*)، افزایش در تعداد شاخ و برگ و افزایش گل‌های تولیدی را به همراه داشت (Gharib, 2007). در مطالعه‌ای روی تاج خروس قرمز (*Amaranthus retroflexus*) مشخص گردید که تیمار اسیدسالیسیلیک در غلظت بالا، افزایش ارتفاع گیاه، تعداد برگ، وزن تر و خشک گیاه و طول ریشه را به همراه داشت (Kumar *et al.*, 1997, Khavari-Nejad *et al.*, 2006). نتایج تیمار اسیدسالیسیلیک روی صفات ریخت‌شناختی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) حاکی از آن بود که در اکثر موارد کاربرد این ماده و افزودن به غلظت تا سطح سه (غلظت 10^{-4} مول) سبب افزایش در صفات رویشی و زایشی اندازه‌گیری شده گردید و کاربرد غلظت بالاتر اسیدسالیسیلیک (10^{-6} مول) اثر منفی بر میزان صفات و عملکرد داشت (Khavari-Nejad *et al.*, 2006). محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک روی بخش‌های هوایی گیاهان ریحان و مرزنگوش باعث افزایش درصد و کیفیت اسانس شد (Gharib, 2007).

گزارش‌هایی از اثر اسیدسالیسیلیک بر افزایش عملکرد برخی گیاهان مانند سویا (*Glycine soja*) (Klessig & Malamy, 1994)، لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) (Yue *et al.*, 2009) و نخود فرنگی (*Pisum sativum*) (Pramod Kumar *et al.*, 1999) منتشر شده است. مطالعات نشان داد که کاربرد اسیدسالیسیلیک اگزوژن (بیرونی)، باعث افزایش میزان محصول در ماش (*Vigna radiata*) (Khandaker *et al.*, 2011) و افزایش مقاومت به عوامل بیماری زا در گیاهانی مانند توتون (*Nicotiana tabacum* و تنباکو (*Nicotiana Rustica*) (Dong ShuTing *et al.*, 1997) شد. همچنین نشان داده شد که تزریق اسیدسالیسیلیک در محیط آب‌کشت بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) منجر به تغییراتی در ترکیب‌های کومارینی برگ‌های این گیاه شد (Salehi *et al.*, 2005). در پژوهشی، تیمار سالیسیلیک اسید در برگ‌های جو منجر به افزایش آنتی‌اکسیدانت‌ها شد (Ananieva *et al.*, 2004).

با بررسی بیات و همکاران (Bayat *et al.*, 2011) در خصوص تأثیر محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک بر خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک دانهال خیار تحت تنش خشکی مشاهده شد که اسید سالیسلسک، میزان سطح برگ و شاخص کلروفیل را به‌ترتیب ۶۰ و ۱۵ درصد افزایش داد (Bayat *et al.*, 2011). قطر ساقه، ارتفاع بوته، تعداد برگ، وزن خشک شاخساره و ریشه و زیست‌توده با کاربرد اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد.

آزمایش حاضر با هدف بررسی اثر مقادیر مختلف اسیدسالیسیلیک در زمان‌های مختلف محلول‌پاشی، بر برخی صفات کمّی و کیفی گیاه کاکوتی طراحی شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ در شرایط مزرعه‌ای، به‌صورت کرت‌های خرد شده در زمان در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی شیروان (عرض جغرافیایی ۴۰/۳۷ درجه، طول جغرافیایی ۹۳/۵۷ درجه و با ارتفاع ۱۰۹۷ متر از سطح دریا) و در شرایط

آزمایشگاهی گروه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. کاشت بذر گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) به‌صورت جوی و پشته‌ای به‌فاصله روی ردیف ۱۵ و بین ردیف ۵۰ سانتی‌متر در تاریخ ۲۵ اسفند ماه ۱۳۹۳ در کرت‌هایی به ابعاد ۲ × ۲ متر انجام شد. بلافاصله پس از کاشت، آبیاری انجام شد و بعد از ۲۰ روز که بذرها به‌خوبی جوانه زدند، آبیاری دوم صورت گرفت. آبیاری در فواصل هفت روز و عملیات وجین علف‌های هرز نیز هفته‌ای یک‌بار به‌صورت دستی انجام شد. بذر این گیاه از مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید.

اسیدسالیسیلیک (Sigma Aldrich, 99.5%) در سه مرحله از رشد گیاه یک‌ساله (آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گل‌دهی)، در غلظت‌های (صفر، 10^{-2}، 10^{-4} و 10^{-6} مولار) در سه تکرار محلول‌پاشی شد. اولین محلول‌پاشی (آغاز رشد رویشی یعنی در زمان دو یا سه‌برگی) در تاریخ ۱۵ فروردین ماه سال ۱۳۹۴، دومین محلول‌پاشی (در حین رشد رویشی یعنی اواسط رشد وقتی گیاه به ارتفاع ۱۰ یا ۱۵ سانتی‌متری رسید) در تاریخ ۱۵ اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۴ و سومین محلول‌پاشی (در زمان گل‌دهی) در اول تیرماه سال ۱۳۹۴ انجام شد.

برداشت بوته‌ها در ۲۰ تیر ماه سال ۱۳۹۴ بدون فاصله از سطح زمین انجام شد. به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها به‌مدت یک هفته در شرایط سایه قرار داده شدند. اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجر و به‌روش تقطیر با آب، در شرایط کاملاً یکسان و به‌مدت چهار ساعت انجام شد. برای اسانس‌گیری ۳۰ گرم نمونه خشک در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب استفاده گردید. پس از محاسبه درصد اسانس، عملکرد آن نیز در واحد مترمربع (گرم در مترمربع وزن خشک بوته)، از عملکرد وزن خشک اندام هوایی بوته در هر مترمربع تعیین گردید. جهت اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی، ابتدا از نمونه‌ها عصاره تهیه گردید. به‌منظور تهیه عصاره، ابتدا نمونه‌های خشک با آسیاب برقی به‌خوبی خرد و مقدار یک گرم از هر نمونه به ارلن ۵۰ میلی‌لیتری انتقال یافته و با متانول ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، عصاره از کاغذ صافی عبور داده شد و از آن برای اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنل کل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها استفاده شد.

اندازه‌گیری فنل کل: محتوای فنل با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو اضافه شد. پس از پنج دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات یک مولار به محلول افزوده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس جذب نمونه در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در مقابل بلانک قرائت شد. اسیدگالیک به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به‌کار رفت.

اندازه‌گیری فلاونوئید: میزان فلاونوئید با استفاده از معرف آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره متانولی (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط ۳۰ دقیقه بعد از نگهداری در تاریکی، در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. کوئرسیتین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد.

اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدانت: برای اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل)، ابتدا یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی با یک میلی‌لیتر DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط گردید. برای نمونه شاهد یک میلی‌لیتر متانول خالص به‌جای یک میلی‌لیتر عصاره متانولی قرار داده شد و برای بلانک از متانول خالص استفاده شد. بعد از ۳۰ دقیقه تاریکی، نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شدند. اعداد به‌دست آمده از جذب نمونه توسط معادله ۱ به درصد مهار رادیکال آزاد (RSA) تبدیل شد.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = \frac{(AC-AS)}{AC} \times 100 \quad (1)$$

که در آن، AC و AS: به‌ترتیب برابر با عدد جذب کنترل و نمونه می‌باشد. اعداد به‌دست آمده برابر با درصد مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره متانولی (۰/۱ ppm) نمونه‌ها می‌باشد

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد انجام شده و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری JMP استفاده گردید.

نتایج و بحث

عملکرد وزن تر و خشک

براساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، وزن تر و خشک تحت تأثیر تیمار اسیدسالیسیلیک، زمان و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند. با توجه به شکل ۱، بیشترین وزن تر (۲۶۴/۷۶۳ گرم بر مترمربع) و خشک (۹۳/۱۱ گرم بر مترمربع) مربوط به غلظت 10^{-2} مولار اسیدسالیسیلیک در حین رشد رویشی و کمترین آن مربوط به نمونه شاهد در زمان گل‌دهی بود. گزارش شده است که اسیدسالیسیلیک از طریق افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و افزایش کلروفیل، میزان فتوسنتز کل را افزایش می‌دهد و در نتیجه، موجب افزایش وزن خشک گیاه می‌گردد (Singh & Kaur, 1980). وزن ۱۰۰ دانه یکی از ارکان اصلی در بالا بردن عملکرد گیاهان می‌باشد و می‌توان افزایش وزن ۱۰۰ دانه را به‌دلیل

بهبود در افزایش جذب عناصر غذایی، فرآیند فتوسنتز و انتقال بیشتر آسیمیلات‌ها از منبع به مخزن دانست که با یافته‌های دیگر محققان هم‌خوانی دارد (Grieve *et al*., 1992; Pastírová *et al*., 2004; Arfan *et al*., 2007). این مطالب بیانگر آن هستند که تیمار اسید سالیسیلیک باعث افزایش عملکرد از طریق افزایش در تعداد غلاف، تعداد دانه در غلاف و وزن ۱۰۰ دانه می‌شود (Pastírová *et al*., 2004). فویل و همکاران (Faville *et al*., 1999) دریافتند که میزان فتوسنتز با عملکرد گیاهان زراعی رابطه مستقیمی دارد (Faville *et al*., 1999). با توجه به این گزارش‌ها می‌توان این‌گونه استدلال کرد که احتمالاً به‌خاطر بیشتر بودن میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی در رقم مقاوم، میزان فتوسنتز و در نتیجه، تولید مواد حاصل از فتوسنتز افزایش یافته که منجر به افزایش عملکرد نهایی شده است. این نتایج با یافته‌های به‌دست آمده توسط شبانی و احسانپور (Shabani et Ehsanpour., 2010) مطابقت دارد که گزارش کردند بیشترین عملکرد دانه در ارقامی به‌دست می‌آید که دارای میزان فتوسنتز بیشتری بودند (Shabani & Ehsanpour, 2010).

ارتفاع بوته

با توجه به جدول تجزیه واریانس، ارتفاع بوته‌ها در تیمار اسیدسالیسیلیک، زمان و اثر متقابل اسیدسالیسیلیک و زمان در سطح یک درصد معنی‌دار گردید. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۲) نشان داد که بیشترین ارتفاع بوته (۲۹/۰۱ سانتی متر) را تیمار $۱۰^{-۲}$ مولار اسیدسالیسیلیک در حین رشد رویشی و کمترین آن را نمونه شاهد (۲۳/۲۴ سانتی متر) در زمان گل‌دهی داشت. در یک بررسی گزارش شد، استفاده از اسیدسالیسیلیک موجب افزایش تقسیم سلولی درون مریستم و در نتیجه، موجب افزایش ارتفاع بوته می‌شود (Yue *et al*., 2009). همچنین در تحقیق دیگری گزارش شد که استفاده از اسیدسالیسیلیک، ارتفاع بوته سویا را افزایش داد (Gutiérrez-Coronado *et al*., 1998). به نظر می‌رسد که اسیدسالیسیلیک با افزایش میزان کلروفیل در برگ‌هایی که در آغاز فرآیند پیری هستند، می‌تواند سبب افزایش مجدد فتوسنتز و در نتیجه، افزایش رشد گردد (Mozaffarian, 1998). قریب (Gharib, 2007) در یک بررسی نشان داد که اسیدسالیسیلیک از طریق افزایش فعالیت‌های فتوسنتزی، رشد و ارتفاع گیاهان ریحان و مرزنجوش را افزایش داد داد (Gharib, 2007). باکری و همکاران (Bakry *et al*., 2012) بیان کردند که اسیدسالیسیلیک با افزایش تقسیم و طویل شدن سلولی، افزایش فعالیت‌های آنزیمی و تولیدات فتوسنتزی توانست رشد گیاه کتان را بهبود و منجر به افزایش ارتفاع گیاه گردد (Bakry *et al*., 2012).

درصد اسانس

براساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس، درصد اسانس تحت تأثیر اسیدسالیسیلیک، زمان و اثر متقابل این دو معنی‌دار نگردید. براساس نتایج جدول ۲، در بین غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک، بیشترین درصد اسانس (۱/۶۶ درصد) مربوط به غلظت $۱۰^{-۲}$ مولار و در زمان گل‌دهی و کمترین میزان آن (۰/۳۳ درصد) مربوط به شاهد (صفر) و در حین رشد رویشی بود. غریب (۲۰۰۶) در بررسی تأثیر اسیدسالیسیلیک بر دو گیاه دارویی ریحان و مرزنجوش نشان داد که کاربرد اسیدسالیسیلیک $۱۰^{-۴}$ مولار سبب افزایش کمیت اسانس در هر دو گیاه گردید، و نیز درصد اسانس در ریحان تحت تأثیر غلظت $۱۰^{-۴}$ مولار اسیدسالیسیلیک افزایش یافت، با این وجود درصد اسانس در مرزنجوش تحت تأثیر اسیدسالیسیلیک در غلظت $۱۰^{-۴}$ مولار کاهش یافت (Gharib, 2007).

عملکرد اسانس

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر اسیدسالیسیلیک بر عملکرد اسانس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد، امّا این مشخصه تحت تأثیر زمان محلول‌پاشی و اثر متقابل اسیدسالیسیلیک و زمان معنی‌دار نگردید. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بالاترین عملکرد اسانس (۱/۱۴ میلی‌گرم در مترمربع) در حین رشد رویشی و در غلظت $۱۰^{-۲}$ مولار اسیدسالیسیلیک و کمترین میزان آن (۰/۲۲ میلی‌گرم در مترمربع) در زمان گل‌دهی و در شاهد مشاهده گردید. بوچر و همکاران (Bouttcher *et al*., 1999) گزارش کردند که محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در گیاهان ریحان و مرزنجوش باعث افزایش عملکرد اسانس در مقایسه با شاهد شد (Böttcher *et al*., 1999). همچنین در ریحان باعث افزایش درصد اسانس گردید، امّا در مرزنجوش نتیجه مخالف را نشان داد و باعث کاهش درصد اسانس شد. افزایش عملکرد اسانس تحت تأثیر اسیدسالیسیلیک می‌تواند با افزایش در رشد رویشی، جذب مواد غذایی، تغییر در تعداد غدد حاوی اسانس و سنتز مونوترپن‌ها مرتبط باشد. کاربرد اسیدسالیسیلیک خارجی می‌تواند باعث افزایش غلظت درونی آن گردد که احتمال دارد تولید متابولیت‌های ثانویه ناشی از افزایش این اسید گیاه باشد. همچنین اسیدسالیسیلیک می‌تواند با تأثیر بر جذب عناصر غذایی گیاه، در افزایش ازت و فسفر که از عناصر مهم در تولید اسانس و عملکرد اسانس گیاه می‌باشد، مؤثر واقع شده و در نهایت، منجر به افزایش سنتز اسانس شود.

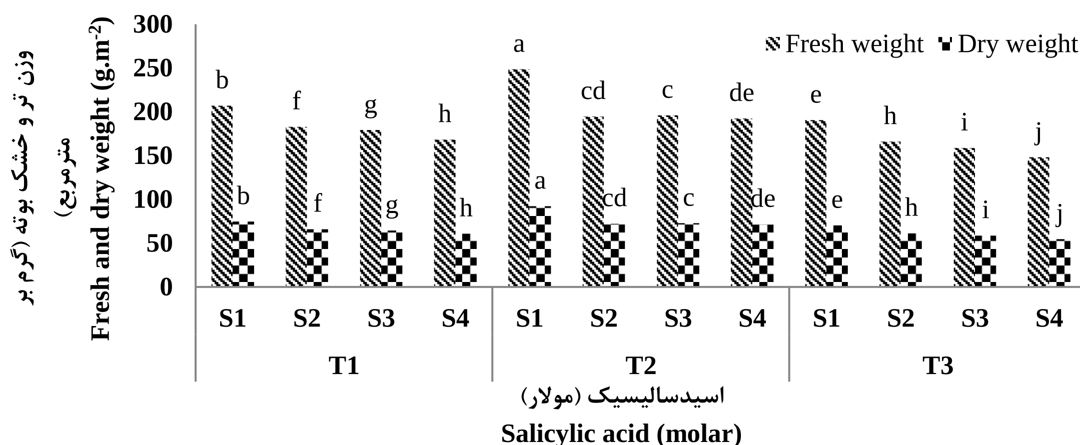
جدول ۱ -تجزیه واریانس اثر زمان محلول‌پاشی و غلظت اسیدسالیسیلیک بر صفات گیاه کاکوتی

Table 1– ANOVA for the effect of time and concentration of salicylic acid on some attributes in *Ziziphora clinopodioides* Lam.

منبع تغییرات S.O.V	درجه ازادی df	میانگین مربعات Mean squares: وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight	ارتفاع بوته Plant height	درصد اسانس Essential oil percentage	عملکرد اسانس Essential oil yeild	میزان فنل کل Total phenol content	میزان فلاونوئید Flavonoid content
زمان محلول‌پاشی Time of sparying	2	5340.641**	791.8974**	16.47191**	0.0266028 ns	0.0423648 ns	0.0138877**	0.0168887**
خطای عامل اصلی Main factor error	6	327.203	1.4212	0.06261	0.1562750	0.0686139	0.0001842	0.0001516
غلظت اسیدسالیسیلیک Salicylic acid concentration	3	3647.586**	494.4340**	16.84046**	0.1095556 ns	0.1905346**	0.0191562**	0.0087954**
غلظت × زمان Concentration × time	6	164.811**	23.6561**	1.68133**	0.0690028 ns	0.0369823 ns	0.0159083**	0.0014421**
میانگین مربعات خطا Mean square error	22	90.79	0.538	0.02810	0.078913	0.034306	0.000349	0.000105
ضریب تغییرات CV		0.142	0.1406	0.0656	0.2770	0.3149	0.1798	0.1839

*و **: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد، ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار

*,**: Significant at 5 and 1% possibility level respectively; ns: None significant

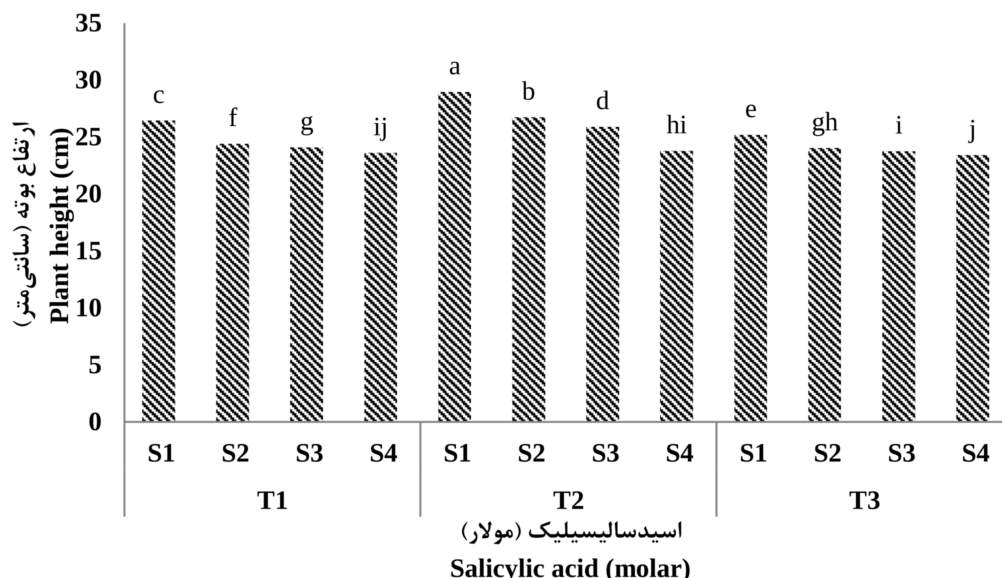


شکل ۱- اثر سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک بر وزن تر و خشک گیاه کاکوتی

Figure 1- The fresh and dry herb weight of *Ziziphora clinopodioides* Lam. under different levels of salicylic acid

(غلظت‌های S1، S2، S3 و S4 به‌ترتیب ۱۰-۲، ۱۰-۴، ۱۰-۶ مولار اسیدسالیسیلیک و صفر (شاهد) و زمان‌های T1، T2 و T3 زمان‌های متفاوت کاربرد اسیدسالیسیلیک به‌ترتیب در آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گل‌دهی بوده و مقایسه میانگین ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد می باشد).

(S1, S2, S3, S4 show 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} M and zero (control) salicylic acid concentrations respectively and T1, T2, T3 are salicylic acid application times at the beginning of vegetative growth, during vegetative growth and flowering time respectively) (DMRT, $p \leq 0.05$)



شکل ۲- اثر سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک بر ارتفاع بوته در گیاه کاکوتی

Figure 2- The plant height of *Ziziphora clinopodioides* Lam. under different levels of salicylic acid

(غلظت‌های S1، S2، S3 و S4 به‌ترتیب ۲-۱۰، ۴-۱۰، ۶-۱۰ مولار اسیدسالیسیلیک و صفر (شاهد) و زمان‌های T1، T2 و T3 زمان‌های متفاوت کاربرد اسیدسالیسیلیک به‌ترتیب در آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گل‌دهی بوده و مقایسه میانگین ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد می باشد).

(S1, S2, S3, S4 show 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} M and zero (control) salicylic acid concentrations respectively and T1, T2 , T3 are salicylic acid application times at the beginning of vegetative growth, during vegetative growth and flowering time respectively) (DMRT, $p\leq 0.05$)

جدول ۲- اثرات ساده غلظت اسیدسالیسیلیک و زمان محلول‌پاشی بر درصد و عملکرد اسانس گیاه کاکوتی

Table 2- The effect of application times and levels of salicylic acid on the essential oil content and yield of *Ziziphora clinopodioides* Lam.

تیمارها Treatments		درصد اسانس Essential oil percentage (%)	عملکرد اسانس (میلی‌گرم در مترمربع) Essential oil yeild (mg.m^{-2})
غلظت اسیدسالیسیلیک Salicylic acid concentration	S1	1.16 ^{a*}	0.92 ^{a}
	S2	1.07 ^{a}	0.71 ^{bc}
	S3	1.15 ^{a}	0.75 ^{ab}
	S4	0.92 ^{a}	0.56 ^{c}
زمان‌های مختلف کاربرد اسیدسالیسیلیک Different times to apply salicylic acid	T1	1.08 ^{a}	0.71 ^{a}
	T2	1.03 ^{a}	0.80 ^{a}
	T3	1.12 ^{a}	0.69 ^{a}

S1، S2، S3 و S4: به‌ترتیب غلظت‌های ۲-۱۰، ۴-۱۰، ۶-۱۰ مول اسیدسالیسیلیک و صفر (شاهد) وT1، T2 و T3: زمان‌های متفاوت کاربرد اسیدسالیسیلیک به‌ترتیب در آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گل‌دهی می‌باشند.

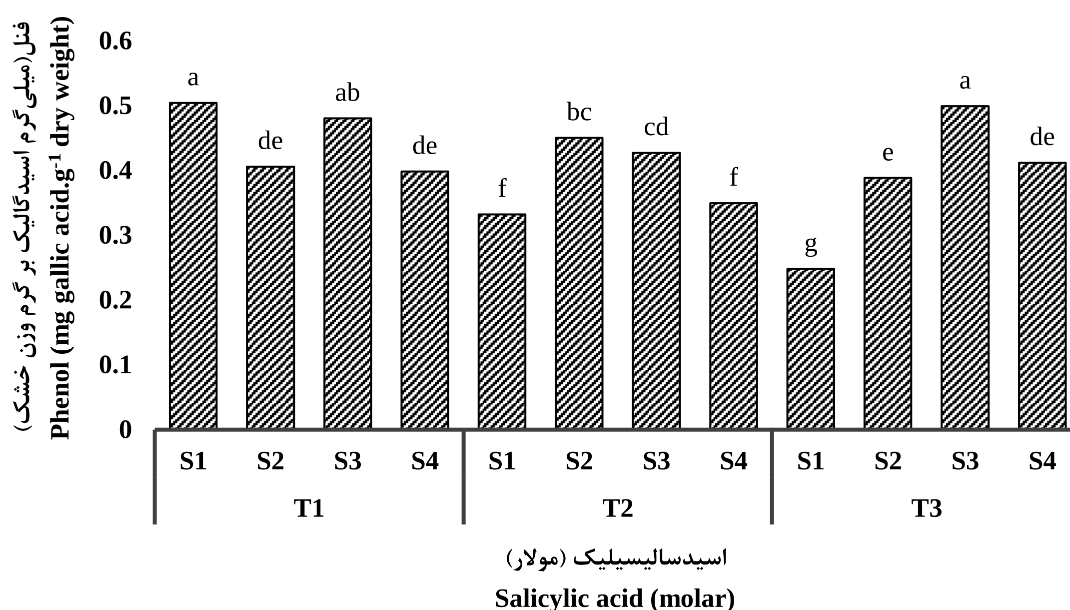
* در هر ستون، اعداد دارای حروف مشابه از نظر آماری در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

(S1 , S2, S3, S4 show 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} M and zero (control) concentrations of salicylic acid respectively and T1, T2, T3 are salicylic acid application times at the beginning of vegetative growth, during vegetative growth and flowering time respectively)

* In each column, the numbers with the same letters are not significant at the %5 of probability levels based on Duncan's multiple range test.

محتوای فنل کل

براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، میزان فنل کل در اثر اسیدسالیسیلیک، زمان محلول‌پاشی و اثر متقابل اسید و زمان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. با توجه به نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، در بین تیمارها، تیمار ۲-۱۰ مول اسیدسالیسیلیک و در آغاز رشد رویشی دارای بیشترین میزان فنل کل (۰/۵۰ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک بر گرم وزن خشک) و تیمار ۲-۱۰ مولار اسیدسالیسیلیک در زمان گل‌دهی دارای کمترین میزان فنل کل (۰/۲۴ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک بر گرم وزن خشک) بودند (شکل۳).



شکل ۳ - اثر سطوح مختلف اسیدسالیسیک بر میزان تغییرات فنل کل در گیاه کاکوتی

Figure 3-The phenol changes of *Ziziphora clinopodioides* Lam. under different levels of salicylic acid

(غلظت‌های S1، S2، S3 و S4 به‌ترتیب ۲-۱۰، ۴-۱۰، ۶-۱۰ مول اسیدسالیسیلیک و صفر (شاهد) و زمان‌های T1، T2 و T3 زمان‌های متفاوت کاربرد اسیدسالیسیلیک به‌ترتیب در آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گل‌دهی بوده و مقایسه میانگین ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد می باشد.)

(S1, S2, S3, S4 show10^{-2} , 10^{-4}, 10^{-6} M and zero (control) salicylic acid concentrations respectively and T1, T2, T3 are salicylic acid application times at the beginning of vegetative growth, during vegetative growth and flowering time respectively) (DMRT, $p \leq 0.05$)

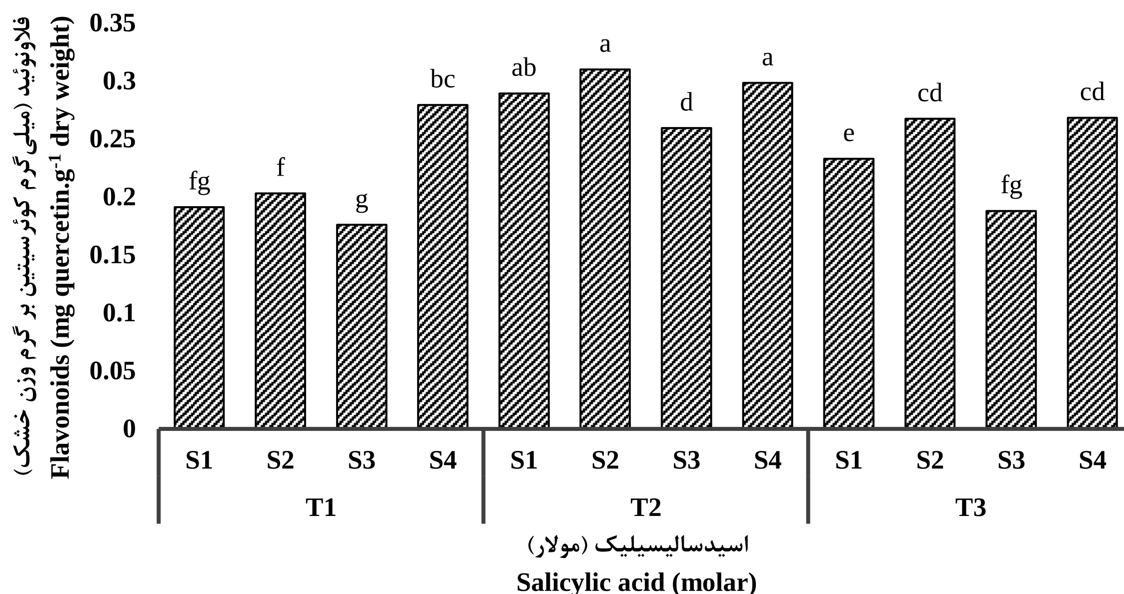
فلاونوئید

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که میزان فلاونوئید در تیمار اسیدسالیسیلیک، زمان محلول‌پاشی و اثر متقابل اسیدسالیسیلیک و زمان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید. براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، در بین داده‌ها بیشترین میزان فلاونوئید (۰/۳۱ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک) را تیمار ۴-۱۰ مولار اسیدسالیسیلیک در حین رشد رویشی و کمترین میزان (۰/۱۷ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک) را تیمار ۶-۱۰ مولار اسیدسالیسیلیک در آغاز رشد رویشی به خود اختصاص دادند (شکل ۴).

کاربرد اسیدسالیسیلیک به‌عنوان عامل تنش‌زا موجب تولید طیف وسیعی از فلاونوئیدها می‌شود. پاستیروا و همکاران (Pastirova *et al.*, 2004) بیشترین مقدار آمبلی فرون را در ۷۲ ساعت بعد از کاربرد یک میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک مشاهده کردند (Pastírová *et al.*, 2004). در یک بررسی، در غلظت‌های ۵۰ و ۲۵۰ مایکرومولار تغییری در ترکیب آمبلی فرون مشاهده نشد، ولی افزایش بسیار معنی‌داری در میزان اسیدهای فنلی مشاهده شد (Bayat *et al.*, 2011). زینعلی و همکاران (Zeynali *et al.*, 2008) طی تحقیقی مشاهده کردند که متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک تاحدی سبب افزایش ترکیبات فنل و فلاونوئید کل در کشت شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) گردید. در ضمن، آن‌ها پیشنهاد دادند که دو ترکیب مذکور سبب فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز شده که در نهایت، سبب افزایش مواد مؤثره فنل و فلاونوئید می‌شود (Zeynali *et al.*, 2008).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، از نتایج این آزمایش چنین استنباط می‌شود که اثر متقابل تیمار اسیدسالیسیلیک و زمان محلول‌پاشی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید، به‌طوری‌که استفاده از ۲-۱۰ مولار اسید سالیسیک و در حین رشد رویشی، بیشترین تأثیر را در افزایش عملکرد وزن تر و خشک، ارتفاع و عملکرد اسانس گیاه کاکوتی دارد. در مورد محتوای فنل کل، تیمار ۲-۱۰ مولار و در آغاز رشد رویشی و در مورد مقدار فلاونوئید تیمار ۴-۱۰ مولار و در حین رشد رویشی بیشترین تأثیر را دارا بود. در ضمن، علی رغم اینکه اثر متقابل تیمار اسیدسالیسیلیک و زمان محلول‌پاشی روی درصد و عملکرد اسانس معنی‌دار نشد، امّا غلظت ۲-۱۰ مولار اسید سالیسیک باعث دستیابی به بیشترین مقدار درصد و در نتیجه، عملکرد اسانس گردید و توانست با بهبود رشد گیاه، عملکرد اسانس را افزایش دهد.



شکل ٤- اثر سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک بر میزان تغییرات فلاونوئید در گیاه کاکوتی

Figure 4- The flavonoid changes of *Ziziphora clinopodioides* Lam. under different levels of salicylic acid

غلظت‌های S1، S2، S3 و S4 به‌ترتیب ۲-۱۰، ۴-۱۰، ۶-۱۰ مول اسیدسالیسیلیک و صفر (شاهد) و زمان‌های T1، T2 و T3 زمان‌های متفاوت کاربرد اسیدسالیسیلیک به‌ترتیب در آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گل‌دهی بوده و مقایسه میانگین ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد می باشد.)

(S1, S2, S3, S4 show 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} M and zero (control) salicylic acid concentrations respectively and T1, T2, T3 are salicylic acid application times at the beginning of vegetative growth, during vegetative growth and flowering time respectively) (DMRT, $p \leq 0.05$)

References

1- Ananieva, E.A., Christov, K.N., & Popova, L.P. (2004). Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. *Journal of Plant Physiology*, *161*, 319–328. https://doi.org/10.1078/0176-1617-01022

2- Arfan, M., Athar, H.R., & Ashraf, M. (2007). Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress?. *Journal of Plant Physiology*, *164*(6), 685-694. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.05.010

3- Babakhanloo, M., Mirza, M., Sefidkon, V.A.L., Graceful, D., & Asgar, P. (1998). *Ziziphora clinopodioides* Investigate the chemical composition of the essential oil of allium (*Z. clinopodioides*). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, *2*, 114-103. (In Persian)

4- Bakry, B.A., El-Hariri, D.M., Sadak, M.S., & El-Bassiouny, H.M.S. (2012). Drought stress mitigation by foliar application of salicylic acid in two linseed varieties grown under newly reclaimed sandy soil, *Journal of Applied Sciences Research*, *8*(7), 3503-3514.

5- Bayat, H., Mardani, H., Arouie, H., & Salahvarzi, Y. (2011). Effects of salicylic acid on morphological and physiological characteristics of cucumber seedling (*Cucumis sativus* cv. Super Dominus) under drought stress. *Journal of Plant Production Research*, *18*(3), 63-76.

6- Böttcher, H., Günther, I., & Bauermann, U. (1999). Physiological postharvest responses of marjoram (*Majorana hortensis* Moench). *Postharvest Biology and Technology*, *15*(1), 41-52. https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00065-9

7- Chachoyan, A.A., & Oganesyan, G.B. (1996). Antitumor activity of some species of the family Lamiaceae. *Rastitelnye Resursy*, *32*(4), 59-64.

8- Dong ShuTing, D.S., Gao RongQi, G.R., Hu ChangHao, H.C., Wang QunYing, W.Q., & Wang KongJun, W.K. (1997). Study of canopy photosynthesis properties and high yield potential after anthesis in maize. *Zuo Wu Xue Bao; 23*(3), 318-325.

9- Faville, M.J., Silvester, W.B., Green, T.A., & Jermyn, W.A. (1999). Photosynthetic characteristics of three asparagus cultivars differing in yield. *Crop Science*, *39*(4), 1070-1077. https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X003900040019x

10- Gharib, F. (2007). Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. 294-301.
11- Grieve, C.M., Lesch, S.M., Francois, L.E., & Maas, E.V. (1992). Analysis of main-spike yield components in salt-stressed wheat. *Crop Science*, *32*(3), 697-703.
12- Gutiérrez, C., Antonio, M., Trejo-López, C., & Larqué-Saavedra, A. (1998). Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, *36*(8), 563-565. https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80003-X
13- Jaiswal, P., & Bhambie, S. (1989). Effect of growth regulating substances on podding and yield of *Vigna radiata* (L.) Wilczek (mung bean). pp. 54-58.
14- Jamzad, Z. (2009). New species and new plant records of Lamiaceae from Iran. *The Iranian Journal of Botany*, *15*(1), 51-56.
15- Khandaker, L., Akond, A.M., & Oba, S. (2011). Foliar application of salicylic acid improved the growth, yield and leaf's bioactive compounds in red amaranth (L.). *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 74*(1), 77-86. https://doi.org/10.2478/v10032-011-0006-6
16- Khavari-Nejad, R., & Asadi, A.K. (2006). The effect of salicylic acid on some of the secondary metabolites (saponins and anthocynins) and induction of antimicrobial resistance in the medicinal plant *Bellis perennis* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, *21*(4), 553-586. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2006.115038
17- Klessig, D.F., & Malamy, J. (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology*. *26*, 1439-1458. https://doi.org/10.1007/BF00016484
18- Kumar, P., Dube, S., Mani, V., & Chauhan, V., (1997). Effect of salicylic acid on flowering, pod formation and yield of pea (*Pisum sativum* L.). National Seminar on Plant Physiology for Sustainable Agriculture, IARI, New Delhi, March.
19- Mahdipour, M. (2013). The impact of organic fertilizers, mineral and salicylic acid on yield components and some secondary metabolites of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). M.Sc. Thesis, Government - Ministry of Science, Research, and Technology, Iran. (In persian)
20- Mozaffarian, V., (1998). A dictionary of Iranian plant manes. 2nd. *Farhang Moaser Publication, Tehran*.
21- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S.M., & Ghorbani, A. (2005). Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *4*(2), 63-79. https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.619
22- Pastírová, A., Repčák, M., & Eliašová, A.J.P.S. (2004). Salicylic acid induces changes of coumarin metabolites in *Matricaria chamomilla* L. *Plant Science*, *167*(4), 819-824. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.027
23- Pramod Kumar, P.K., Dube, S., & Chauhan, V., (1999). Effect of salicylic acid on growth, development and some biochemical aspects of soybean (*Glycine max* L. Merrill). pp. 327-330.
24- Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhar, F., Nejad-Ebrahimi, S.M., Yousefzadi, J.B., & Bulletin, P., (2005). Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. rigida (B OISS.) RECH. f. from Iran. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *28*(10), 1892-1896. https://doi.org/10.1248/bpb.28.1892
25- Shabani, L., & Ehsanpour, A. (2010). Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in *in vitro* culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. *Iranian Journal of Biology, 22*(4), 691-703. https://sid.ir/paper/21603/en
26- Singh, G., & Kaur, M. (1980). Effect of growth regulators on podding and yield of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Indian Journal of Plant Physiology*, *23*, 366-370
27- Yue, W., Shao-Ting, D., Ling-Ling, L., Huang, L.D., Ping, F., Xian-Yong, L., Zhang, Y.S., & Hai-Long, W.J.P. (2009). Effect of CO_2 elevation on root growth and its relationship with indole acetic acid and ethylene in tomato seedlings. *Pedosphere, 19*(5), 570-576. https://doi.org/10.1016/S1002-0160(09)60151-X
28- Zeynali, H., Khoulanjani, M., Bagheri, M., Golparvar, R., Jafarpour, M., & Shiranirad, A.H. (2008). Effect of different planting time and nitrogen fertilizer rates on flower yield and its components in German chamomile (*Matricaria recutita*). *Iranian Journal of Crop Sciences, 10*(3), 220-230.